

doi:10.3969/j.issn.1000-484X.2015.04.008

## DcR3 重组蛋白对糖尿病大鼠心肌组织凋亡相关分子的表达及细胞凋亡的作用

黄黎月 庄国洪<sup>①</sup> 丘劲华<sup>①</sup> 陈福<sup>②</sup> 陶惠然<sup>①</sup> (厦门医学高等专科学校 厦门 361008)

中图分类号 R392.6 文献标志码 A 文章编号 1000-484X(2015)04-0472-05

**[摘要]** 目的:研究诱骗受体 3(DcR3)在正常大鼠、糖尿病(DM)大鼠心肌组织的表达,DcR3 重组蛋白对心肌组织凋亡相关分子表达以及心肌细胞凋亡的影响,探讨 DcR3 对 DM 大鼠心肌细胞凋亡的作用。方法:一次性腹腔注射链脲佐菌素建立大鼠 DM 模型,尾静脉注射不同剂量的 DcR3 重组蛋白[1.2 mg/(鼠·d)、0.8 mg/(鼠·d)、0.4 mg/(鼠·d)]40 d。RT-PCR 检测心肌组织 DcR3 mRNA、Fas mRNA、FasL mRNA 的表达。Western blot 分析凋亡相关蛋白 Bcl-2、Caspase-8 的表达。双抗夹心 ELISA 检测血液中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 LFN- $\gamma$  水平的变化,HE 染色观察心肌细胞凋亡的百分率。结果:DcR3 治疗组大鼠与 DM 组比较心肌组织 DcR3 mRNA 高表达,Fas mRNA、FasL mRNA 表达下调,Caspase-8 蛋白水平下调,Bcl-2 蛋白水平上调,以中剂量组的作用最明显。各 DcR3 治疗组血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  水平均有不同程度的降低( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ )。心肌细胞凋亡的百分率下降( $P < 0.05$ )。结论:DcR3 重组蛋白有抑制 DM 大鼠心肌细胞凋亡的作用,其机制与竞争 Fas,阻断 FasL 诱导细胞凋亡,心肌细胞表达 DcR3,凋亡相关因子 Caspase-8 下调、Bcl-2 上调及细胞因子水平的降低有关。

**[关键词]** DcR3 重组蛋白;糖尿病;心肌细胞凋亡;凋亡相关分子

### Action of DcR3 recombinant protein of myocardial tissue in diabetic rats

HUANG Li-Yue, ZHUANG Guo-Hong, QIU Jin-Hua, CHEN-Fu, TAO Hui-Ran. Xiamen Medical College, Xiamen 361008, China

**[Abstract]** **Objective:** To study the expression of DcR3 of myocardial tissue in diabetic mouse and normal rats and the impact of DcR3 recombinant protein to the expression of related molecules and myocardial cell apoptosis to discuss the action of DcR3 to myocardial cell apoptosis in Diabetic rats. **Methods:** Intraperitoneally injected streptozotocin one time to establish the model of Diabetic rats. Injected different doses of DcR3 recombinant protein to tail vein [1.2 mg/(rat·d), 0.8 mg/(rat·d), 0.4 mg/(rat·d)] 40 d. The expression of DcR3 mRNA, Fas mRNA and FasL mRNA of myocardial tissue was detected with RT-PCR; the expression of apoptosis related molecules Bcl-2 and Caspase-8 was analyzed with Western blot; the IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and LFN- $\gamma$  of the blood was detected with double antibody sandwich ELISA; the percentage of myocardial cell apoptosis was observed with HE dyeing. **Results:** To compare the DcR3 treatment group with diabetic group, the expression DcR3 of myocardial tissue was high, the expression of Fas mRNA and FasL mRNA was descended. The Caspase-8 protein was ascended and the Bcl-2 protein was descended. The middle dose group was the most obvious. the IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in the blood was descended differently in each DcR3 treatment group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The percentage of myocardial cell apoptosis was declined ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** DcR3 recombinant protein have the action of inhibiting the rats' myocardial cell apoptosis, the mechanism is related to competing with Fas, blocking-up FasL of inducing apoptosis, expressing DcR3 of myocardial cell, the descending of apoptosis related factors Caspase-8, the ascending of Bcl-2 and the reduction of cytokine levels.

**[Key words]** DcR3 recombinant protein; Diabetes; Myocardial cell apoptosis; Apoptosis related molecules

糖尿病是心力衰竭发生的一个独立危险因素,目前关于糖尿病心肌病过程中心肌细胞凋亡作用的研究报道较少。心肌细胞凋亡与 DM 的发生、发

展密切相关<sup>[1,2]</sup>。Fas/FasL 信号系统是心肌细胞凋亡的重要信号转导系统。诱骗受体 3(Decoceptor 3, DcR3) 是肿瘤坏死因子受体(Tumor necrosis factor receptor, TNFR) 超家族新成员,能竞争性地与 FasL 及 LIGHT 结合并抑制其介导的细胞凋亡<sup>[3-5]</sup>,故提示 DcR3 可能对 DM 心肌细胞凋亡有保护作用。DcR3 mRNA 在正常大鼠和 DM 大鼠心肌组织的表达如何? 外源性 DcR3 重组蛋白对 DM 心肌细胞凋亡有无保护作用? 对 DM 大鼠心肌凋亡相关分子的表达有何影响? 这些问题目前尚未见相关文献

①厦门大学医学院,厦门 361102。

②厦门大学医学院实验动物中心,厦门 361102。

作者简介:黄黎月(1964 年-),女,生理教研室主任,副教授,主要从事生理学 jianyao 研究。

通讯作者及指导教师:陶惠然(1955 年-),女,病理生理教研室主任,教授,主要从事病理生理学教学研究, E-mail: taohuiran@163.com。

报导,本文就此作初步探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 60 只,体重(200 ± 2) g, 2 月龄,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。自由饮食、水,适应性饲养 5 d 后开始实验。

**1.1.2 主要试剂** 链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ) Sigma 公司产品,大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 和  $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 的 ELISA 检测试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司,Trizol 试剂、AMV 一步法 RT-PCR 试剂盒购自上海生工公司。兔抗 Caspase-8 mAb、Bcl-2 mAb 和 HRP 标记的大鼠抗兔 IgG 抗体购自 Sigma 公司。DcR3 蛋白由本实验室制备(纯度 ≥ 99%)<sup>[6]</sup>。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物分组及 DM 模型的建立** 将大鼠随机分成 6 组,每组 10 只。A 组:Normal (正常对照组); B 组:Normal + DcR3 [0.8 mg/(鼠·d)]; C 组:DM 组; D 组:DcR3 重组蛋白低剂量 [0.4 mg/(鼠·d)] 治疗组; E 组:DcR3 重组蛋白中剂量 [0.8 mg/(鼠·d)] 治疗组; F 组:DcR3 重组蛋白高剂量 [1.2 mg/(鼠·d)] 治疗组。大鼠禁食(约 8 h)不禁水, C、D、E、F 组大鼠于左下腹腔内一次性注射 STZ (50 mg/kg), A、B 组大鼠注射与 STZ 同体积的磷酸盐缓冲液。48 h 后用血糖仪检测血糖,重复 2 次以非空腹血糖超过 16.7 mmol/L 的大鼠为制模成功,本实验的制模成功率为 100%,实验过程中有 6 只大鼠死亡被剔除。

B、D、E、F 组大鼠每天一次尾静脉注射相应剂量的 DcR3, A、C 组大鼠注射同体积的生理盐水,连续用药 40 d,测大鼠血糖、尿糖、体重及尿量。40 d 后处死大鼠,进行各项指标检测。

**1.2.2 血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$  含量的检测** 摘除大鼠眼球取血,分离血清, -20℃ 冻存备用。采用双抗夹心 ELISA 检测大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$  的含量。

**1.2.3 RT-PCR 分析心、肝、脾、肺、肾、胰腺和睾丸组织中 Fas、FasL 和 DcR3 mRNA 的表达** 用 Trizol 试剂提取各组组织器官中的总 RNA,进行 RT-PCR。以 2~4  $\mu$ l 逆转录产物为模板,分别以扩增 DcR3、Fas、FasL 基因的引物,以  $\beta$ -actin 基因为内参照,进行 PCR。DcR3 基因 mRNA 序列:上游引物:5'-TAG GCC ATG GAT GTG GCA G-3',下游引物:5'-CAA

GAT GCA TGC TCC AAG-3',序列长度为 320 bp。Fas 上游引物:5'-CAT GAC AAT CCA GGA AGC-3',下游引物:5'-CCA AGG TCC TTC TGG ACC-3',序列长度为 220 bp。FasL 上游引物:5'-GTA CCA TGG CGA TGC AGC AGC-3',下游引物:5'-ATA CAA AGT ACA GCC CAG-3',序列长度为 580 bp。 $\beta$ -actin 上游引物:5'-TCT TCC AGC CCT CCT TCC TG-3',下游引物:5'-CGT TTC TGC GCC GTT AGG T-3',序列长度为 409 bp。反应条件为:95℃ 变性 4 min,95℃ 变性 45 s,55℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,循环数 30,72℃ 10 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。Bio-Rad 凝胶成像系统 (Quantity One-4.6) 灰度分析各基因的相对表达量。

**1.2.4 Western blot 检测上述组织 Caspase-8、Bcl-2 的蛋白表达** ① SDS-PAGE:将组织研磨后,加细胞裂解液提取蛋白,然后进行 SDS-PAGE 分离蛋白质。② 转膜:把分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜。③ Ag-Ab 反应:加入一抗,反应 1 h,洗涤液洗涤 3 次;加入 HRP 标记的二抗,反应 1 h,洗涤。④ 显色: DAB 显色。结果判断和数据处理:胶片或考马斯兰干胶后采用 Gel-doc 200 扫描,用 Quantity one 软件进行条带分析。

**1.2.5 心肌细胞凋亡的观察** 取各组大鼠左心室前壁组织,行常规脱水、包埋及组织切片,做 HE 染色。光镜下观察并做半定量分析:随机抽取 C 组和 E 组各 10 张切片,400 倍高倍视野下,用标准的 10 × 10 目镜方格测试系统计数 10 个视野凋亡细胞数目,取其均值。

**1.3 统计学处理** 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,计量资料的组间显著性检验采用单因素方差分析。

## 2 结果

**2.1 DcR3 对大鼠血糖、尿糖、体重及尿量的影响** DcR3 对正常大鼠血糖、尿糖、体重及尿量无明显影响。A 组 (Normal) 大鼠血糖 (6.9 ± 0.12) mmol/L,尿糖 (-),体重 (338.6 ± 23.18) g,24 h 尿量 (12.75 ± 4.11) ml。B 组 (Normal + DcR3) 血糖 (7.1 ± 0.24) mmol/L,尿糖 (-),体重 (353.6 ± 28.31) g,24 h 尿量 (13.23 ± 5.17) ml, A 组与 B 组间各项指标无显著性差异。C 组的大鼠血糖 (22.6 ± 3.77) mmol/L,尿糖 (+ + + ~ + + + +),体重 (190.48 ± 27.04) g,24 h 尿量 (58.75 ± 18.17) ml,各项指标均显著高于 A 组 ( $P < 0.01$ )。不同剂量的 DcR3 连续治疗 40 d 后结果发现, D、E、F 与 C 组比较血糖呈下降趋势,但无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。尿糖、体重及

尿量差异无显著性 ( $P > 0.05$ , 数据略)。

2.2 大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IFN- $\gamma$  水平的变化

B 组与 A 组比较,血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IFN- $\gamma$  水平无显著性差异 ( $P > 0.05$ );造模后 40 d,C 组的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  较 A 组的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  明显增加 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );D、E、F 组与 C 组相比,血清的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IFN- $\gamma$  水平均有不同程度的降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  表 1)。

2.3 各组织中 Fas、FasL 和 DcR3 mRNA 的表达

2.3.1 DcR3 mRNA 的表达 应用 RT-PCR 检测 A 组、B 组、C 组、D 组、E 组及 F 组大鼠各器官 DcR3 mRNA 的表达。结果提示:A 组 DcR3 mRNA 在心、脾、肺、肾中有明显表达,睾丸组织中弱表达,其他组织中无表达。B 组 DcR3 mRNA 在心、肺、肾、胰腺中有明显表达,其他组织中无表达。C 组 DcR3 mRNA 在肝、肺、肾中有明显表达,其他组织中无表达。D 组 DcR3 mRNA 在心、肝、肺、胰腺中有表达,其他组织中无表达;E 组 DcR3 mRNA 在心、肺、睾丸中有明显表达,其他组织中无表达;F 组 DcR3 mRNA 在心、肝、肺、肾中有明显表达,其他组织中无

表达(图 1)。DcR3 mRNA 的表达产物大小为 320 bp,电泳结果与理论计算值相符。

2.3.2 Fas、FasL mRNA 的表达 应用 RT-PCR 检测各组大鼠各器官中 Fas mRNA 的表达。结果提示:Fas mRNA 在 A 组大鼠心、肝、脾、肺、肾、胰腺、睾丸中均有表达;B 组 Fas mRNA 在心、肝、脾、肾、胰腺中均有表达,其他组织中无表达;C 组 Fas mRNA 在心、肝、脾、肺中有明显表达,其他组织中无表达;D 组 Fas mRNA 在心、肾、胰腺中有表达,其他组织中无表达,E 组 Fas mRNA 在心肌组织无表达,只在脾、睾丸组织中有表达;F 组在心肌组织无表达,在脾、肺、肾中明显表达(图 2)。Fas mRNA、FasL mRNA 的表达产物大小为 220 bp 和 585 bp,电泳结果与理论计算值相符。

FasL mRNA 在 A 组大鼠心及脾、肺、肾、睾丸中有表达,其他组织中未见表达;B 组 FasL mRNA 在心及脾、肺、胰腺中有明显表达,其他组织中无表达;C 组 FasL mRNA 在所有组织中均有表达;D 组 FasL mRNA 在心及脾、肺、肾、胰腺中有表达,其他组织无表达;E 组 FasL mRNA 在心、肾组织中无表达,其他

表 1 DcR3 对大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IFN- $\gamma$  水平的影响( $\bar{x} \pm s$   $n = 6$ )

Tab.1 Effects of DcR3 on TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$  in DM rats serum( $\bar{x} \pm s$   $n = 6$ )

Groups	Dose [mg/(rat · d)]	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	IL-1 $\beta$ (pg/ml)	IFN- $\gamma$ (pg/ml)
A group (Normal)	-	24.41 $\pm$ 0.30	65.80 $\pm$ 12.48	0.088 $\pm$ 0.01
B group (Normal + DcR3)	0.8	25.20 $\pm$ 0.31	67.56 $\pm$ 10.31	0.089 $\pm$ 0.03
C group (DM)	-	33.88 $\pm$ 0.32 <sup>1)</sup>	163.85 $\pm$ 10.24 <sup>2)</sup>	0.115 $\pm$ 0.03
D group (DM + DcR3)	0.4	23.77 $\pm$ 0.29 <sup>3)</sup>	80.32 $\pm$ 9.31 <sup>4)</sup>	0.085 $\pm$ 0.04 <sup>4)</sup>
E group (DM + DcR3)	0.8	24.51 $\pm$ 0.33 <sup>3)</sup>	85.28 $\pm$ 11.03 <sup>4)</sup>	0.082 $\pm$ 0.01 <sup>4)</sup>
F group (DM + DcR3)	1.2	23.95 $\pm$ 0.30 <sup>3)</sup>	75.71 $\pm$ 10.06 <sup>4)</sup>	0.079 $\pm$ 0.02 <sup>4)</sup>

Note:1)  $P < 0.05$  2)  $P < 0.01$  vs normal;3)  $P < 0.05$  4)  $P < 0.01$  vs DM.

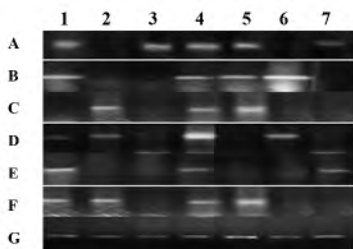


图 1 RT-PCR 检测各组织中 DcR3 mRNA 的表达  
Fig.1 mRNA expression of DcR3 was measured by RT-PCR DcR3

Note: 1. Heart; 2. Liver; 3. Spleen; 4. Lung; 5. Kidney; 6. Pancreas; 7. Testicle; A. Normal; B. Normal + DcR3; C. DM; D. DM + DcR3 (0.4); E. DM + DcR3 (0.8); F. DM + DcR3 (1.2); G.  $\beta$ -actin.

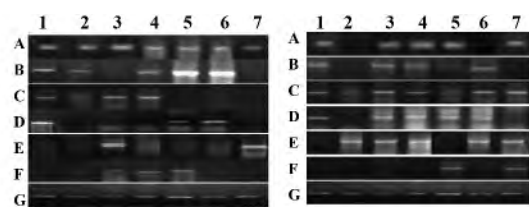


图 2 RT-PCR 检测各组织中 Fas、FasL mRNA 的表达  
Fig.2 mRNA expression of Fas and FasL was measured by RT-PCR

Note: Left: Fas mRNA; Right: FasL mRNA. 1. Heart; 2. Liver; 3. Spleen; 4. Lung; 5. Kidney; 6. Pancreas; 7. Testicle; A. Normal; B. Normal + DcR3; C. DM; D. DM + DcR3 (0.4); E. DM + DcR3 (0.8); F. DM + DcR3 (1.2); G.  $\beta$ -actin.

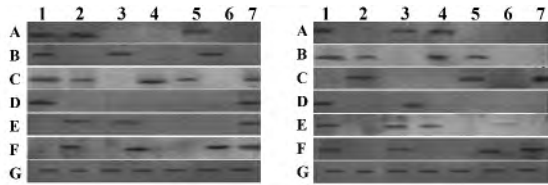


图 3 Western blot 检测各组织中 Caspase-8、Bcl-2 蛋白的表达

Fig. 3 Protein expression of Caspase-8 was measured by Western blot

Note: Left. Caspase-8; Right. Bcl-2. 1; Heart. 2. Liver; 3. Spleen; 4. Lung; 5. Kidney; 6. Pancreas; 7. Testicle; A. Normal; B. Normal + DcR3; C. DM; D. DM + DcR3 (0.4); E. DM + DcR3 (0.8); F. DM + DcR3 (1.2); G.  $\beta$ -actin.

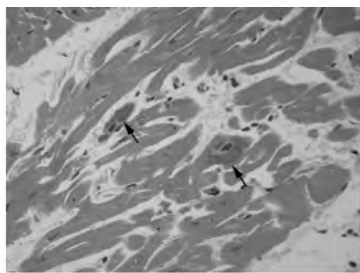


图 4 心肌细胞的凋亡 (HE 10 × 40)

Fig. 4 Apoptosis of myocardial cells (HE 10 × 40)

Note: The arrows show the apoptosis of myocardial cells, the cells' eosinophilia is increased in microscope.

组织中有明显表达;F 组 FasL mRNA 在心及肝、脾、胰腺中无表达,在肾、睾丸组织中有表达。

**2.4 Caspase-8、Bcl-2 蛋白的表达** 应用 Western blot 检测各组大鼠各器官中 Caspase-8、Bcl-2 蛋白的表达。结果提示:Caspase-8 蛋白在 A 组大鼠心及肝、肾中有表达,在其他组织中未见表达;B 组 Caspase-8 蛋白在心、脾、胰腺中有明显表达,其他组织中无表达;C 组 Caspase-8 蛋白在心及肝、肺、肾、睾丸中有表达,而在脾、胰腺中无表达;D 组 Caspase-8 蛋白在心和睾丸中有表达,其他组织中无表达;E 组 Caspase-8 蛋白在肝、肺、睾丸中有表达,在心肌组织中无表达;F 组 Caspase-8 蛋白在肝、肺、胰腺、睾丸中有明显表达,心及脾、肾中无表达。(图 3)。Caspase-8、Bcl-2 蛋白的表达产物分别为 55 kD 和 26 kD,电泳结果与理论计算值相符。

Bcl-2 蛋白在 A 组大鼠心及脾、肺中有表达,在其他组织中未见表达;B 组 Bcl-2 蛋白在心、肝、肺、肾中有明显表达,胰腺、脾及睾丸中无表达;C 组 Bcl-2 蛋白在肝、肾、睾丸中有弱表达,在心、脾、肺、胰腺组织中无表达;D 组 Bcl-2 蛋白在心、脾中有表

表 2 重组蛋白 DcR3 对大鼠心肌细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$  apoptosis cells/mm<sup>2</sup>)

Tab. 2 Effects of DcR3 on myocardium apoptosis in rats ( $\bar{x} \pm s$   $n = 6$  apoptosis cells/mm<sup>2</sup>)

Groups	Dose [mg/(rat · d)]	Change of myocardium apoptosis
A group	-	1.41 ± 1.30 <sup>4)</sup>
B group	0.8	2.20 ± 1.31 <sup>4)</sup>
C group	-	24.88 ± 6.32 <sup>2)</sup>
D group	0.4	21.77 ± 5.89 <sup>2)</sup>
E group	0.8	14.51 ± 7.03 <sup>1)3)</sup>
F group	1.2	18.95 ± 6.45 <sup>2)</sup>

Note: 1)  $P < 0.05$ , 2)  $P < 0.01$  vs normal; 3)  $P < 0.05$ , 4)  $P < 0.01$  vs DM.

达,而在其他组织中无表达;E 组 Bcl-2 蛋白在心、脾和肺中有表达,在肝、肾、胰腺和睾丸中均无表达;F 组 Bcl-2 蛋白在心、脾、胰腺和睾丸中有明显表达,其他组织中无表达。

**2.5 心肌细胞凋亡的计算** 与正常组相比 DM 组心肌细胞凋亡数量增加明显,差异显著 ( $P < 0.01$ ),见图 4;而 DM + DcR3 (0.8) 组,心肌细胞凋亡数量明显减少,与 DM 组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ),见表 2。

### 3 讨论

诱骗受体 3 (Decoy receptor 3, DcR3) 是 1998 年 Pitti 等<sup>[7]</sup>发现的一组肿瘤坏死因子受体 (Tumor necrosis factor receptor, TNFR) 超家族成员,它能竞争性地与 LIGHT 和 FasL 结合并抑制其介导的细胞凋亡。对肿瘤细胞 HT29 的生存能力分析表明, FasL 诱导 HT29 细胞的凋亡具有剂量依赖性,最大效应浓度为 1 ~ 10 ng/ml,而在 DcR3. Fc 存在的情况下,即使 FasL 的浓度达到 100 ng/ml, FasL 也不能诱导细胞凋亡。胰岛移植的研究发现, DcR3 可抑制 FasL、IFN- $\gamma$  诱导的胰岛细胞凋亡,从而预防胰岛移植后胰岛原发性无功能的发生。给严重的非肥胖糖尿病且免疫缺陷大鼠用 DcR3. Fc 培养的树突突细胞治疗后,能延缓糖尿病的发病进程和严重程度,提示 DcR3 与 DM 的发生、发展密切相关。

细胞凋亡是由体内外因素触发细胞内预存的死亡程序而导致的细胞死亡过程。研究表明心肌细胞凋亡参与缺血性心脏病、缺血再灌注损伤、心力衰竭、病毒性心肌炎等病理过程,并在其中发挥着重要作用。Fiordaiso 等<sup>[8]</sup>用 STZ 诱导大鼠 DM 3 d 后心肌细胞凋亡明显增加,在 4 周时心肌细胞 30% 呈散

在点状凋亡,存活的心肌细胞体积增大。Backlund 等<sup>[9]</sup>研究发现随着 DM 心功能障碍的加重,心肌细胞凋亡数量增加。已有研究证实在心肌细胞凋亡的同时促凋亡相关分子 Fas、FasL 和 Bax 的表达明显上调,凋亡抑制分子 Bcl-2 随着细胞凋亡的增加表达明显减弱,而且 Fas 表达水平与 DM 的病程进展相一致<sup>[10]</sup>。本研究发现在 STZ 诱导大鼠 DM 40 d 时,心肌细胞的胞浆浓染、细胞核固缩、细胞凋亡明显增加,存活的心肌细胞肥大。心肌组织中 Fas 和 FasL 的表达明显上调,Bcl-2 的表达下调,这些实验结果与上述文献报道基本一致。

近年的研究发现,DM 大鼠心肌细胞凋亡时心肌组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  转化酶 (TACE) 高表达<sup>[11]</sup>。TNF- $\alpha$  刺激白介素 1 (IL-1) 等细胞因子的生成并参与心肌病理变化过程。本研究各实验组大鼠连续用 DcR3 重组蛋白 40 d 后,空白对照组大鼠血清中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  水平与正常对照组比较无显著性差异;损伤组的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IFN- $\gamma$  水平较正常对照明显升高;三个剂量的 DcR3 治疗组均可使 DM 大鼠血清的 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  水平有不同程度的显著性降低,且 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  水平的降低呈明显的剂量依赖性。

通过 RT-PCR 检测各组大鼠心肌组织中 DcR3 mRNA 的表达,发现外源性 DcR3 重组蛋白对 DM 大鼠心肌细胞凋亡的作用可能与细胞表面 DcR3 (内源性) 的表达差异有相关性,中剂量和高剂量的 DcR3 作用于 DM 大鼠后,增加了心肌组织中 DcR3 mRNA 的表达。降低了心肌组织 Fas mRNA 和 FasL mRNA 的表达,使 FasL 与心肌组织中的效应细胞表面 Fas 的结合减少,降低了效应细胞的活化,从而减少了相关细胞因子的分泌;高表达的 DcR3 能竞争性地与 FasL 结合,抑制其介导的细胞凋亡,我们推测 DcR3 的差异性表达可能是选择性抑制心肌细胞凋亡的关键环节。

本文应用 Western blot 检测各组大鼠各器官中 Bcl-2、Caspase-8 蛋白的表达时发现,Bcl-2 仅在 DM 组大鼠肝、肾和睾丸组织中有表达,心肌组织中均未见表达;Caspase-8 在 DM 组大鼠除脾和胰腺之外,心肌和其他各组织均有明显表达,提示 Bcl-2、Caspase-8 与 DM 心肌细胞凋亡的发生相关。给予外源性 DcR3 重组作用于 DM 大鼠后,心肌组织中 Bcl-2 的表达上调,Caspase-8 蛋白的表达下调。Bcl-2 促进细胞生存,延长细胞寿命,抑制细胞凋亡的作用是增高线粒体的跨膜电位和阻止线粒体膜通透性

的改变,使 Bcl-2 的表达上调,阻止凋亡启动因子如细胞色素 C 等的释放,切断细胞凋亡级联反应。Caspase-8 是细胞凋亡过程中介导死亡受体途径的启动酶,中剂量和高剂量的 DcR3 使 DM 大鼠心肌 Caspase-8 蛋白表达下调,提示可能通过抑制死亡受体介导的凋亡途径,抑制了心肌细胞凋亡的发生。

综上所述,本实验发现外源性 DcR3 可使 DM 大鼠心肌组织中 DcR3 mRNA 的表达增加,Fas mRNA 和 FasL mRNA 的表达下调,Bcl-2 的表达上调,Caspase-8 蛋白的表达下调,细胞因子水平降低,使 DM 大鼠心肌细胞凋亡的百分率下降。这对认识 DcR3 抑制 DM 大鼠心肌细胞凋亡的作用,以及深入研究糖尿病心肌细胞凋亡的分子机制提供新的启示。

### 参考文献:

- [1] Cao L, Wang Y, Zhou G, *et al.* Attenuation by metallothionein of early cardiac cell death via suppression of mitochondrial oxidative stress results in a prevention of diabetic cardiomyopathy [J]. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48(8):1688-1697.
- [2] Sajjad A, Novoyatleva T, Vergarajauregui S, *et al.* Lysine methyltransferase Smyd2 suppresses p53-dependent cardiomyocyte apoptosis [J]. *Biochim Biophys Acta* 2014; 8:2556-2562.
- [3] Wortinger MA, Foley JW, Larocque P, *et al.* Fas ligand-induced murine pulmonary inflammation is reduced by a stable decoy receptor 3 analogue [J]. *Immunology* 2003; 110:225-233.
- [4] Wang W, Zhang M, Sun W, *et al.* Reduction of decoy receptor 3 enhances TRAIL-mediated apoptosis in pancreatic cancer [J]. *PLoS One* 2013; 8(10):e74272.
- [5] Shen E, Li Y, Li Y, *et al.* Rac1 is required for cardiomyocyte apoptosis during hyperglycemia [J]. *Diabetes*, 2009, 58(10):2386-2395.
- [6] 李文珠, 陶惠然, 颜江华, 等. DcR3 的构建、表达纯化及特异性鉴定 [J]. *细胞与分子免疫学杂志* 2006; 22(2):151-153.
- [7] Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, *et al.* Genomic of decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer [J]. *Nature*, 1998, 369:699-703.
- [8] Fiordaliso F, Li B, Latimi R, *et al.* Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats in angiotensin dependent [J]. *Lab Invest*, 2000; 80(4):513.
- [9] Backlund T, Palojoki E, Saraste A, *et al.* Sustained cardiomyocyte apoptosis and left ventricular remodeling after myocardial infarction in experimental diabetes [J]. *Diabetologia* 2004; 47(2):325-330.
- [10] Ho FM, Liu SH, Liu CS, *et al.* High Glucose induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activation of C-junNH(2)-terminal kinase and caspase-3 [J]. *Circulation*, 2000, 101(22):2618-2624.
- [11] 钟文亮, 庄维特, 陈刚, 等. 肿瘤坏死因子- $\alpha$  和肿瘤坏死因子- $\alpha$  转化酶在糖尿病心肌病大鼠心肌中的表达 [J]. *中华糖尿病杂志* 2005; 13(4):306-308.

[收稿 2014-10-08 修回 2014-12-08]

(编辑 倪鹏)